第 32 卷 第 1 期
1989 年 2 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 32, No. 1
Feb., 1989

论淡色库蚊敌百虫抗性品系的抗药性机理

黄 刚　　黄品箴
（中国科学院上海昆虫研究所，上海）

摘要　分别测定了淡色库蚊（*Culex pipiens pallens*）敏感品系（SEN）及敌百虫抗性品系（RD）雌成蚊的乙酰胆碱酯酶（AchE）对硫代乙酰胆碱（ATch）的米氏常数（K_m）和最大反应速度（V_{max}）。SEN 雌成蚊头部 AchE 的 $K_m = 1.2\times10^{-4}$mol/L，$V_{max} = 7.7\times10^{-3}$mol/L（产物）；胸部的 $K_m = 0.8\times10^{-4}$mol/L，$V_{max} = 6.5\times10^{-3}$mol/L（产物）。RD 雌成蚊头部 AchE 的 $K_m = 5.7\times10^{-4}$mol/L，$V_{max} = 25\times10^{-3}$mol/L（产物）；胸部的 $K_m = 0.8\times10^{-4}$mol/L，$V_{max} = 9.5\times10^{-3}$mol/L（产物）。结果表明：1. SEN 和 RD 二者的雌成蚊，它们自身头、胸间 AchE 是不同质的，是以同工酶的形式存在，因此 RD 雌成蚊头部 AchE 的性质与 SEN 雌成蚊的头部有显著差异也是由 AchE 同工酶的变异所造成。2. RD 雌成蚊头部 AchE 在量上与 SEN 间也存在明显的差异。因此可以认为 RD 雌成蚊对有机磷产生抗性的主要机理是头部 AchE 在质和量上产生了变异。由于羧酸酯酶不是对具有磷酸酯键的有机磷制剂作用的靶子酶，因而不是敌百虫抗性产生的主要原因。

关键词　淡色库蚊　敌百虫　抗性　乙酰胆碱酯酶

绝大多数近代化学杀虫剂，如有机磷剂、氨基甲酸酯类、环戊二烯类、有机氯以及拟除虫菊酯类等，都是作用于动物体的首要靶组织——神经系统，这是哺乳类动物及昆虫最敏感也是最脆弱的部位。不同药剂作用于神经组织的不同部位，因而产生抗药性的机理也有所不同。有机磷剂和氨基甲酸酯类主要作用于胆碱能激性的神经系统，尤其是对 AchE 的抑制作用。大量使用有机磷剂，使昆虫群体的 AchE 处于药剂选择压力的影响下，浓集了昆虫群体中对有机磷剂产生敏感度降低的 AchE 基因频率，从而导致昆虫对有机磷剂的抗性。据 1985 年的统计，全世界对各类杀虫剂产生抗性的农业害虫已达 400 种（Robert, 1985），而 1980 年的统计表明产生抗性的卫生害虫是 171 种（唐振华和黄刚，1982）。目前至少已有 571 种害虫对不同的杀虫剂产生了抗性，其中对有机磷及氨基甲酸酯类产生抗性的大约有 250 种以上。但根据资料由于 AchE 敏感度降低而引起对有机磷剂或氨基甲酸酯类产生抗性的仅有 7 种，其中还包括螨（Hama, 1982），此数字仅占抗性害虫总数的 1%，若把抗性品系也统计在内，则所占比例更低。尽管这类抗性在全世界就其危害程度目前还处于次要地位，但用以研究酶与基因突变关系来进一步探讨抗性形成的原因却具有很重要的理论意义。我们设想这 250 种抗有机磷与氨基甲酸酯类的害虫，除已报道的由于解毒酶的作用或靶子酶敏感度降低所引起的抗性机理外，必然还有一些新的抗性机理未被发现。本文仅就有机磷抗性与 AchE 的关系来探讨这种抗性机理存在的可能性。

材 料 与 方 法

1. 昆虫来源　淡色库蚊（*Culex pipiens pallens*）敏感品系（SEN）及敌百虫抗性

本文于 1986 年 8 月收到。
本文图表均由林爱莲同志覆墨，特此致谢。

品系（RD）实验室选育(唐振华等，1980)。

2. 试剂　碘化硫代乙酰胆碱（ATch），系 ROTH 产品；毒扁豆碱（Eserine)；无色结晶，系 Fluka 产品，纯；5, 5′-Dithio-bis (2-Nitrobenzoic Acid) 即 DTNB，系 ROTH 产品。

3. 方法　分别收集实验室饲养的羽化 3—5 天的 SEN 和 RD 雌成蚊若干，先置于家用冰箱的低温格中冷冻片刻，然后埋在冰中再冷冻 1 小时以上，用刀片快速割下头和胸，分别置于 4 个 1.5 毫升的玻璃匀浆器中。每 300 只雌成蚊的头，加入 0.75 毫升 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液(含 0.5% 的 Triton X-100) 中；另每 300 只雌成蚊的胸，加入 1.5 毫升的上述缓冲液。然后置于冰浴中匀浆 5 分钟，用 3,500 转/分离心 15 分钟，取上清液作酶原，并从中取一部分测蛋白质浓度。

AchE 活力测定：按照 Ellman 法(1961)稍加修改。反应系统含有：ATch 1×10^{-3}mol/L，DTNB 1×10^{-3}mol/L，0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液，再加入适量的酶溶液，最后体积为 5 毫升。在 37℃ 反应 5 分钟后，以 1.2×10^{-3}mol/L 毒扁豆碱 1 毫升终止反应，在 412nm 下进行比色测定，比色计为上海分析仪器厂 72 型分光光度计。在同样反应条件下 DTNB 显色的克分子消光系数为 1.36×10^{-4}mol/L，根据此数字计算由酶反应生成产物量表示酶活力或酶反应速度。

蛋白浓度测定：按 Lowry 等(1951)。

用 Michaelis-Menton 方程的双倒数作图法求得米氏常数（K_m）和最大反应速度(V_{max})。

结 果 与 讨 论

我们曾对提纯的 RD 雌成蚊的羧酸酯酶（CarE）进行过测定，结果证实这是一种只水解有机磷剂分子中的羧酸酯键而不能水解绝大多数不含羧酸酯键的有机磷剂的水解酶(黄刚等，1982)，因此命名时既不称它为磷酸酯酶（P-ase)，也不称具有水解广谱有机磷底物的羧酸酯酶，而是根据其特性直接命名为马拉松羧酸酯酶(Malathion-CarE)。作者等在用 ^{14}C 标记的马拉松进行 RD 及 SEN 的药剂穿透代谢研究中也证实 Malathion-CarE 不能水解 P-ase 键(唐振华等，1980)。姜家良等(1984)曾测定过 RD 及 SEN 二者的 P-ase，发现它们间的活力并无明显差异，也证实了 Malathion-CarE 不能水解 P-ase 的底物(陈巧云等，1980)，尽管在此情况下的反应条件并不是 Malathion-CarE 的最适条件。

作者还发现淡色库蚊存在伪胆碱酯酶，并认为 RD 对有机磷的抗性机理似乎与蚜虫类似，从而推测蚜虫体内也存在伪胆碱酯酶(黄刚等，1982)，此推测后被 Brestkin (1985) 所证实。但必须指出的是，Devonshire 和 Moores（1982）所阐明的桃蚜 CarE 具有水解广谱底物的能力不能作为提纯 RD 的 CarE 也是具有这种性质酶的依据，我们用事实证明 RD 的 CarE 与桃蚜的 CarE 在性质上确有明显的不同。

按 Mills 和 Lang 法(1972)测定刚羽化雌成蚊的酸性 P-ase 活力，证明 RD 雌成蚊的酸性 P-ase 活力无差异，说明该酶对 RD 产生抗性亦非主要的。

所有上述事例都否定了 Malathion-CarE 作为对具有磷酸酯键等有机磷剂产生抗性的可能性。据此，我们对另一种有机磷剂的靶子酶——AchE 进行了其在抗性形成中机

理的研究。

首先，我们从昆虫整体对 RD 及 SEN 雌成蚊的靶子酶水平进行了比较，结果发现二者 AchE 的活力确有一定的差异(图 1)。

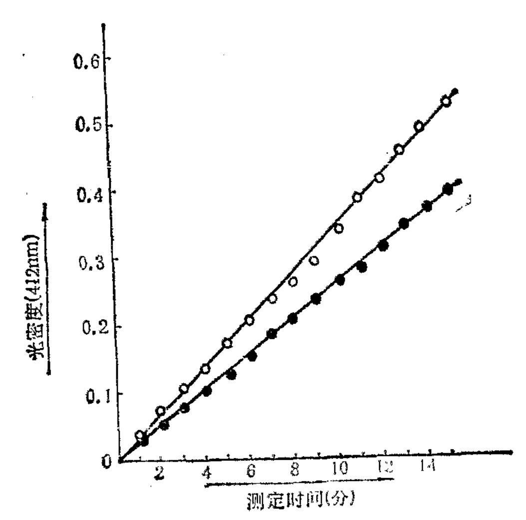


图 1 淡色库蚊 RD 和 SEN 雌成蚊的 AchE 活力比较
●—● SEN 雌成蚊的 AchE 活力 ○—○ RD 雌成蚊的 AchE 活力

图 1 结果显示，RD 雌成蚊 AchE 的活力高于 SEN 的雌成蚊，从而发现了昆虫抗有机磷另一种重要的新机理，即有机磷剂能诱导昆虫胆碱能激性神经系统 AchE 的生物合成。这一发现无疑加深了对抗性形成原因的进一步认识。

为了更精确的了解，我们又分别测定了 RD 和 SEN 雌成蚊头及胸不同部位 AchE 的活力(表 1)。

表 1 结果表明，RD 雌成蚊头部 AchE 的活力是 SEN 雌成蚊头部的 2 倍，而其胸部 AchE 的活力也高于 SEN 雌成蚊。但由于胸部蛋白质含量正好高出头部 2 倍，故以密度而言头部 AchE 的浓度实际上要高于胸部。因此，在 RD 雌成蚊有机磷抗性与其头、胸部 AchE 的直接相关中，头部显得比胸部更为重要。

表 1 淡色库蚊 RD 与 SEN 雌成蚊头部及胸部 AchE 的活力比较

品 系	乙酰胆碱酯酶 (AchE) 活力，产物量 (mol/L)/ 头或胸/5 分钟 (37℃)*	
	头 部	胸 部
SEN	6×10^{-4}	1.9×10^{-3}
RD	11×10^{-4}	2.3×10^{-3}

* 平均 1 只蚊头含蛋白质量 6 微克，平均 1 只蚊胸含蛋白质量 18 微克

下面我们以双倒数作图法，把反应曲线转换成直线关系，求出各自的 K_m 和 V_{max} 值。从动力学角度进一步分析了 RD 和 SEN 的 AchE 在质和量上变异的关系 (见图 2 和表 2)。

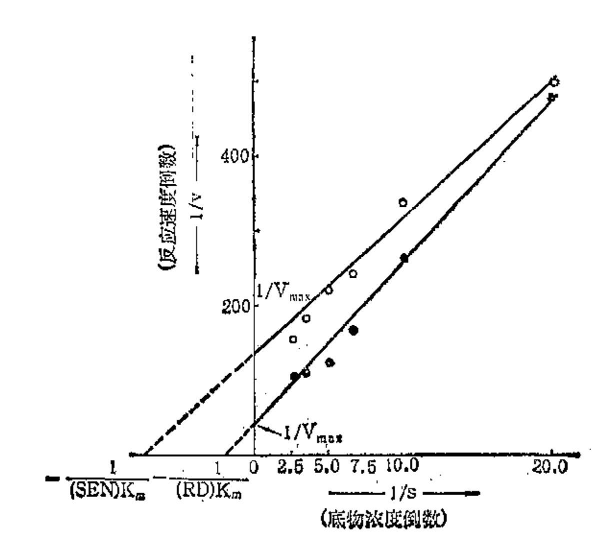


图 2　RD 与 SEN 雌成蚊头部的 K_m 及 V_{max}（双倒数作图法）
○—○ SEN 雌成蚊头部的 AchE　●——● RD 雌成蚊头部的 AchE

表 2　由图 2 求得 RD 与 SEN 雌成蚊头部 AchE 的 K_m 及 V_{max} 值

头部 / 品系	米氏常数 K_m(mol/L)	最大反应速度 V_{max}(mol/L)
SEN	1.2×10^{-4}	7.7×10^{-3}
RD	5.7×10^{-4}	25×10^{-3}

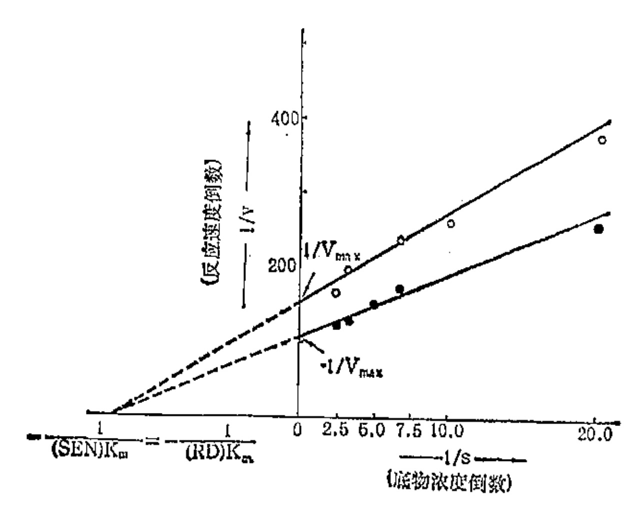


图 3　RD 与 SEN 雌成蚊胸部 AchE 的 K_m 及 V_{max}（双倒数作图法）
○—○ SEN 雌成蚊胸部的 AchE　●——● RD 雌成蚊胸部的 AchE

表3 由图3求得RD与SEN雌成蚊胸部AchE的K_m及V_{max}值

胸部 / 品系	米氏常数 K_m(mol/L)	最大反应速度 V_{max}(mol/L)
SEN	0.8×10^{-4}	6.5×10^{-3}
RD	0.8×10^{-4}	9.5×10^{-3}

动力学分析表明，RD雌成蚊头部 AchE 的K_m值，净高出SEN约4倍，而V_{max}净高出约2倍多，从而显示RD雌成蚊头部AchE在质和量上较SEN均有明显的差异。

但是从二者胸部测得的结果与头部测得的结果有着显著的差异(见图3和表3)。

图3和表3的结果表示出，二者胸部的K_m值相同，都为0.8×10^{-4}mol/L，说明在质上其 AchE 并无差异，至于胸部的V_{max}值，RD仅略高于SEN的约44%，这说明酶量确有所增加，但差异并不显著。

另外，若将表2和表3的K_m值作相互比较时还可发现，SEN雌成蚊头部 AchE 的$K_m=1.2\times10^{-4}$mol/L，胸部 AchE 的$K_m=0.8\times10^{-4}$mol/L；而RD的K_m则分别为5.7×10^{-4}mol/L和0.8×10^{-4}mol/L。上述数据至少可以说明三点：1.二者头和胸之间AchE的性质是不同的，因此头、胸之间的AchE是以同工酶的形式存在的；2.二者胸部AchE的K_m值相同，因此头、胸之间的差异主要是由头部决定的，二者相比，RD头胸之间相差超过6倍，而SEN只超过0.5倍；3.RD的K_m值——5.7×10^{-4}mol/L净高出SEN的K_m值——1.2×10^{-4}mol/L的4倍，所以毫无异议RD与 SEN AchE 质的差异主要是由头部 AchE 同工酶的变异所造成，这也就是我们前面提到的“在有机磷抗性形成中头部显得更为重要”的原因。经初步试验还证明，淡色库蚊的马拉松抗性品系(R_m)也存在同样的类似情况，这将另文发表。

对以上所述还需要补充二点：1.在测定谷胱甘肽转移酶时，应考虑到昆虫体内除含硫的谷胱甘肽外，还存在极丰富的内源含硫巯基化合物（尤其是半胱氨酸），它们与谷胱甘肽的生物合成及谷胱甘肽转移酶的活力都有密切关系。因此，在离体测定这二种化合物的浓度和活力时，必须加入抗坏血酸及乙醛酸，以消除这些内源巯基化合物干扰的影响（Ball, 1966)。2.除极少数生物体(如蛇毒和紫贻贝)的 AchE 是以溶解状态存在外，绝大多数生物体的 AchE 是以膜结合的形式存在于神经细胞及红血球上，因此，如欲研究其 AchE 的真正性质，必须用加有增溶剂(如 Triton X-100)的缓冲液，先把 AchE 从膜上溶解下来，才有可能作动力学的比较研究，若无此步骤而单用蒸馏水抽提(姜家良等，1980)，则绝大部分 AchE 仍与膜结合而未抽提到溶液中，这样所得的结果显然不能反映和阐明 AchE 突变与RD雌成蚊对有机磷产生抗性这一机理的真实情况。

众所周知，有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂结构的设计及合成，主要是依据乙酰胆碱以及 AchE 分子的结构而定的，事实说明RD对有机磷产生抗性最重要的因素是 AchE 在质和量上的变异所致，实验证明RD雌成虫的AchE不被或不易被这类杀虫剂所抑制，从而使神经传导不能被阻断，这就是导致对杀虫剂产生抗性的原因，而已知蚊虫中只有雌蚊

是吸血和传播疾病的媒介，因此应特别重视雌成蚊中 AchE 变异所引起的抗性，因为它对人类健康危害的影响特别大，并给防治带来更大的困难。

由于 AchE 产生变异而使它的活力显著提高，从而延缓了有机磷剂有效作用时间，也就大大地提高了一切解毒酶的表观活力，再加上某些修饰因子如表皮对杀虫剂穿透度的降低等，就使 RD 抗性以几何级数的倍数增长。此时虽然 Malathion-CarE 含量较高，但它只是起蛋白质吸附一部分杀虫剂的作用，当然这也能部分地减缓杀虫剂对神经组织的损害，即对靶子酶也起到了某种程度的保护作用，但它绝对代替不了靶子酶本身对抗性形成所起的关键作用，总的来说它们之间的关系是相辅相成的。

由于 RD 的抗药性是多因子的，以及因 AchE 基因突变导致不易阻断神经传导为主的抗性机理，因此在实际应用中特别应注意以下几点：

1. 在野外测定淡色库蚊群体抗有机磷基因频率时，测定 CarE 不能代表其主要抗性机理。

2. 即使测定了 AchE，也无法确定野外单只成蚊或经单个卵块孵化后所得单只成蚊在该抗性指标时是纯合子还是杂合子。这是因为野外昆虫群体在杀虫剂选择压影响下，虽然浓缩了自然界早已存在的少量抗性基因，但由于多变的环境因素，如使用杀虫剂浓度不统一和使用方法不当、漏掉的死角以及外源的迁入等，除特殊情况外(如蚜虫等)，就一般规律而言，不易产生大量纯合子。因此，野外群体所表现的抗性水平总是较低，此时如用生物测定方法可以灵敏地测出其抗性程度，但用酶法测定则不行，至少灵敏度极差。当酶法能灵敏地测出其抗性程度时，抗性已极高，而这通常只有在实验室处理条件下才能达到。这是因为高抗性是抗性基因在高浓度杀虫剂不断作用下得到充分表达而大量合成诱导酶的结果。但在野外防治中根本不可能用这样高浓度的杀虫剂，这个道理是显而易见的。因此用酶法把在野外群体中测得的抗性划分为低、中、高三个层次系人为，充其量也只是反映群体中个体间的差异，而这种个体间的差异在任何生物群体中都存在，它不反映质的差异。

3. 根据研究结果我们认为，防治淡色库蚊对敌百虫的抗性，应从其 AchE 活性的顺序(幼虫＜雄成蚊＜雌成蚊)来考虑。因此用相同剂量杀虫剂防治效果的顺序应是幼虫＞雄成蚊＞雌成蚊。当然，如能在杀虫剂中加入某些 AchE 的抑制剂(增效剂)，将会大大提高防治效果。

这里还需着重提出的一点是，中央神经系统是生物机体中占支配地位的一个最重要的器官，作为与神经传导作用密切有关的酶，它的变异幅度不可能也不允许太大，否则就会改变中央神经系统执行正常指挥和调节的功能，使整个生物机体的功能陷于紊乱而致死。因此和其他的酶系统不同，AchE 的活性那怕只增加 0.1 倍，就有可能抵得上其他解毒酶活力增加几十倍甚至几百倍所产生的效应。这就是为什么 AchE 的 K_m 和 V_{max} 从表观值看似乎增加不大而在抗性产生中却能发挥如此巨大作用的原因，充分体现了这一特殊酶系所具有的特殊性质及所发挥的特殊作用。

我们深信，随着对害虫有机磷抗性机理的深入研究，今后因 AchE 活力提高而引起有机磷高抗性的害虫种类会不断增加，还可能会发现其他的有机磷抗性形成的新机理。同时我们还认为，RD 的胆碱能激性神经系统的高度发展，可能导致运输金属离子的 ATP

酶活力高于 SEN。

参 考 文 献

姜家良、侯能俊、张朝远 1984 不同敌百虫抗性淡色库蚊幼虫中谷胱甘肽和谷胱甘肽转移酶的比较。昆虫学报 **27**(3): 248—53。

唐振华、张朝远、陈文美、庄佩君、刘维德 1980 淡色库蚊对敌百虫的抗药性研究——抗性谱及联合作用。昆虫学报 **23**(3): 276—85。

唐振华、黄刚、陈巧云 1980 ^{14}C-马拉硫磷在抗性和敏感淡色库蚊中的穿透和代谢作用的研究。昆虫学研究集刊第一集 第 83—88 页。

唐振华、黄刚 1982 《农业害虫抗药性》 第13页。农业出版社。

黄刚、陈巧云、唐振华、姜家良 1982 多种有机磷剂抗性品系淡色库蚊羧酸酯酶的提纯及其对 ^{14}C-马拉硫磷的降解作用。动物学研究 **3** (suppl): 229—36。

Ball, C. R. 1966 Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment in relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochem. Pharmacology,* **15**: 809—16.

Betty, J. M. ms et al 1972 Acid phosphatase profile during the lifespan of the mosquito. *J. Gerontology.* 27(3): 333—7.

Brestkin, A. P. et al 1985 Cholinesterase of aphids——1. Isolation, partial purification and some properties of cholinesterase from spring grain aphids *Schizaphis graminum. Insect Biochem.* 15(2): 309—14.

Devonshire, A. L. et al 1982 A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbomate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids *(Myzus persicae). Pestic. Biochem. Physiol.* **18**: 235—46.

Ellman, G. L. et al 1961 A new and rapid colorimetric determimation of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88.

Hiroshi, H. 1982 Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. pp. 303 in: PEST RESISTANCE TO PESTICIDES, EDS. Georghiou, G. P. & Saito, T. plenum, New York.

Lowry, O. et al 1951 Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem,* **193**: 265.

Robert, M. M. 1985 Population biology: Evolution of pesticide resistance. *Nature* **315**(6014): 12—3.

Yukiko, M. et al. 1984 Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex pipiens*). *Insect Biochem.* **14**(2): 181—8.

ON THE MECHANISM OF DIPTEREX RESISTANCE IN *CULEX PIPENS PALLENS* COQ.

HUANG GANG　　HUANG PIN-JIAN

(Shanghai Institue of Entomology, Academia Sinica, Shanghai)

The activity of acetylcholinesterase (AchE) in the female adults of the susceptible strain (SEN) and resistant strain (RD) of *Culex pipens pallens* Coq. was determined. By comparing the values of K_m and V_{max} of the enzymic activity in the two strains, we draw the following conclusions:

The head AchE is structurally different from the thoracic AchE in the both strains. Structural difference exists also in the head AchE of RD and SEN, but not in the thoracic AchE of the two strains. The V_{max} of the head AchE activity of RD is about two times higher than that of SEN, but that of thoracic AchE of RD is only half that of SEN. Therefore the major mechanism of resistance towards organic phosphorus insecticides of RD resides in the structural and quantitative variation in the head AchE.

The RD has an acid phosphatase activity equal to that of the SEN, but it contains the enzyme malathion-carboxylesterase which displays the following two characteristics: (1) It can hydrolyze malathion and other compounds containing carboxylic bond but not phosphatester bond. (2) It contributes to the resistance of RD towards the insecticides by its absorptive effect. These characteristics make the resistance of the RD belong to the weak type. Therefore the enzyme does not play a major role in the resistance mechanism of that strain.

Key words　*Culex pipens pallens* Coq.—dipterex——resistance——acetylcholinesterase